



Lavagem de Tecido com Manchas de Sangue em uma Máquina Lavadora de Roupas e a Quimiluminescência do Bluestar®

Tissue Washing with Blood Stains in a Washing Machine and Chemiluminescence of Bluestar®

Karina das Chagas^{1,*}, Christian Zamberlan Angheben², Beatriz Álvares Cabral de Barros³, Denise Bolten Lucion Loreto¹, André Alex Baldissera¹,
Mário Marques Fernandes¹

¹ *Departamento de Odontologia Legal, Associação Brasileira de Odontologia Seção Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil*

² *Departamento de Ortodontia, Faculdade Ingá, São Leopoldo, RS, Brasil*

³ *Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil*

* Corresponding author. E-mail: karinadaschagas@gmail.com

Received 17 July 2018

Resumo. O exame de corpo de delito pode constituir-se tarefa árdua para o perito criminal com ênfase em local de crime. A identificação desses vestígios muitas vezes inclui a presença de sangue. O objetivo desse estudo é testar a quimiluminescência do Bluestar® na identificação de manchas de sangue em tecido de algodão após as superfícies terem sido lavadas em diferentes períodos de tempo e com diferentes produtos de lavagem por uma máquina de lavar roupas automática. Sete corpos de prova foram preparados e em cada um deles foi dispensado 2 ml de sangue: um grupo controle, que não sofreu lavagem, e três duplas, divididas de acordo com os seguintes ciclos: algodão, lavagem ecológica e lavagem diária. Em cada dupla, um substrato foi lavado com água e sabão em pó e outro foi lavado com água, sabão em pó e alvejante em pó sem cloro. Os grupos ainda foram divididos de acordo com a quantidade de vezes que foram lavados na lavadora de roupas: os que foram lavados apenas uma vez (t1) e os que tiveram duas lavagens, no qual, além da primeira, tiveram uma segunda lavagem após 60 dias da primeira (t2). Conclui-se que o Bluestar® apresentou quimiluminescência em tecidos de algodão manchados de sangue em t1. Entretanto, em t2, em grupos que tiveram e os que não tiveram uma segunda lavagem, Bluestar® apresentou pouca quimiluminescência, podendo ser confundido com falso positivo,

ou não apresentou reação quimiluminescente, como nos grupos onde foi usado o alvejante em pó sem cloro.

Palavras-chave: Manchas de sangue; Crime; Reações falso-positivas; Investigação laboratorial.

Abstract: The forensic examination can be an arduous task for the criminal expert with an emphasis on a crime scene. Identification of these traces oftentimes includes the presence of blood. The purpose of this study is test the chemiluminescence of Bluestar® in the identification of blood stains in cotton cloth after the surfaces have been washed in different periods of time and with different washing products by an automatic washing machine. Seven samples were prepared and 2 ml of blood was dispensed in each of them: one control group, which was not washed, and three pairs, divided according to the following cycles: cotton, ecological washing and daily washing. In each pair, one substrate was washed with water and washing powder, the other was washed with water, washing powder and non-chlorine powder bleach. The groups were still divided according to the number of times they were washed in the washing machine: those that were washed only once (t1) and those that had two washes, in which, in addition to the first, they had a second wash after 60 days of the first (t2). It is concluded that Bluestar® showed chemiluminescence in cotton cloths stained with blood in t1. However, in t2, in groups that had and those who did not have a second wash, Bluestar® showed little chemiluminescence, could be mistaken for false positive, or did not present a chemiluminescent reaction, as in the groups where non-chlorine powder bleach was used.

Keywords: Blood stains; Crime; False positive reactions; Laboratory research.

1. Introdução

De acordo com o artigo 158 do Código de Processo Penal¹: “Quando a infração deixar vestígios, será indispensável o exame de corpo de delito”. Esse exame pode constituir-se tarefa árdua e por isso há um profissional que o realiza, sendo o perito criminal com ênfase em local de crime. A identificação desses vestígios muitas vezes inclui a presença de sangue, seja visível ou não a olho nu.

O sangue é um tecido conjuntivo líquido que é constituído por água, plasma - composto principalmente por água, proteínas, gorduras e sais orgânicos e minerais – e células. Entre essas células, encontram-se plaquetas, leucócitos e eritrócitos, mais conhecidos por hemácias, que contêm a hemoglobina. A hemoglobina é um complexo responsável pela condução de oxigênio aos tecidos do organismo e é composta por uma porção proteica, chamada globina, e quatro cadeias polipeptídicas ligadas cada

uma a um grupamento prostético heme, constituído por uma parte orgânica e um átomo de ferro².

Para se ter a certeza de que o material a ser analisado é de fato sangue, existem testes presuntivos para verificar essa questão. A maioria destes testes baseia-se na atividade da hemoglobina^{3,4}; entre eles encontram-se a benzidina, a fluoresceína, o luminol e o Bluestar®⁵. No caso do Bluestar®, que se baseia no mesmo mecanismo de reação do luminol, para ocorrer a quimiluminescência é necessário ter um agente oxidante e um catalisador – utiliza-se normalmente um metal de transição. O átomo de ferro, presente na hemoglobina, age como o catalisador que desencadeia a reação quimiluminescente característica do produto^{6,7}.

Muitos criminosos procuram limpar a cena de crime e, devido a isso, o perito deve lembrar que nem todos os vestígios são visíveis a olho nu. O estado de conservação pode ser influenciado por circunstâncias ambientais ou manipulações intencionadas⁸. Nesses casos, o mais comum é a tentativa de limpeza de sangue, seja no próprio agressor, objetos, roupas, entre outros. Miranda *et al.* (2016)⁹ relataram um caso em que houve o entintamento de uma parede após o homicídio na tentativa de encobrir as manchas de sangue; os peritos, na chegada ao suposto local de crime, observaram a tinta fresca, removeram a mesma e aplicaram luminol, o qual reagiu positivamente. A descoberta de sangue permitiu traçar a dinâmica do evento e a ligação da vítima ao local.

Existem várias classificações de manchas de sangue com relação ao mecanismo de geração da mesma. A mais aceita atualmente é a classificação proposta por Stuart H. James *et al.*¹⁰, a qual divide as manchas de acordo com seu mecanismo de geração. Esses autores classificam as manchas em três grupos principais, sendo Passivas, Alteradas ou Spatters (Figura 1). As manchas passivas se desconectam da fonte de sangue devido à força gravitacional; as alteradas são ocasionadas por alguma alteração ambiental externa sobre a mancha de sangue depositada; e as Spatters são manchas formadas por gotas de sangue desconectadas da fonte de sangue por uma força adicional à força gravitacional.



Figura 1. No quadro A foram projetadas manchas passivas, no quadro B manchas alteradas e no quadro C manchas Spatters.

O objetivo do presente estudo é testar a efetividade do produto Bluestar Forensic® na identificação de manchas de sangue em tecido de algodão mesmo após as superfícies terem sido lavadas em diferentes períodos de tempo e com diferentes produtos de lavagem por uma máquina de lavar roupas automática.

2. Materiais e Métodos

2.1. Corpos de Prova

Foram coletados 14 mL de sangue do doador com uma seringa descartável de 20 mL. O sangue foi dispensado sobre os corpos de prova, que eram tecidos de algodão, devidamente identificados em relação ao tipo de lavagem, se sofreria lavagem em lavadora de roupas com sabão em pó ou com sabão em pó e alvejante sem cloro. Em cada substrato foram depositados 2 mL de sangue. Nesse estudo, as manchas de sangue são classificadas como manchas projetadas, que são uma subdivisão das manchas Spatters.

Ao total, foram sete corpos de prova, sendo que um foi o grupo controle (Figura 2), que não sofreu lavagem, e os outros seis foram lavados em uma máquina lavadora de roupas automática (Samsung, modelo WF106U4SAWQ/AZ) divididos em três duplas de acordo com os seguintes ciclos: algodão, lavagem ecológica e lavagem diária. Os ciclos variam de acordo com tempo em cada lavagem, a temperatura e a velocidade de centrifugação: o ciclo Algodão tem um duração de 2 horas e 12 minutos, 1200 rotações por minuto (rpm) e 40°C de temperatura; o ciclo Lavagem Ecológica dura 1 hora e 38 minutos, 1400 rpm e 40°C; já o ciclo Lavagem Diária apresenta uma duração de 1 hora e 22 minutos, 1400 rpm e 30°C.

Em cada dupla, um corpo de prova foi lavado com água e sabão em pó (Omo, Unilever Brasil, São Paulo) e outro corpo de prova foi lavado com água, sabão em pó

(Omo, Unilever Brasil, São Paulo) e alvejante em pó sem cloro, o qual contém percarbonato de sódio - também conhecido como oxigênio ativo (Vanish, Reckitt Benckiser, Brasil).



Figura 2. Grupo controle.

Os grupos, ainda, foram divididos em duas fases de acordo com a quantidade de vezes que foram lavados na lavadora de roupas: grupos que foram lavados apenas uma vez, no qual a lavagem foi realizada um dia após os tecidos serem manchados com sangue, e grupos que tiveram duas lavagens, no qual, além da primeira, tiveram uma segunda lavagem após 60 dias da primeira. Para realizar a segunda lavagem, os corpos de prova foram cortados ao meio, permanecendo uma metade com uma lavagem e outra metade com duas lavagens. Na Figura 3 encontra-se um esquema das lavagens dos corpos de prova em que foi utilizado apenas sabão em pó paralelamente aos corpos em que foi utilizado sabão em pó e alvejante em pó.

Os corpos de prova utilizados foram divididos de acordo com o ciclo de lavagem, de acordo com os produtos utilizados e também de acordo com as fases, referente à quantidade de vezes que foram lavadas. Os grupos foram:

LE1 – lavagem ecológica com sabão em pó, lavado apenas uma vez;

LE2 – lavagem ecológica com sabão em pó, lavado duas vezes;

LD1 – lavagem diária com sabão em pó, lavado apenas uma vez;

LD2 – lavagem diária com sabão em pó, lavado duas vezes;

Ag1 – algodão com sabão em pó, lavado apenas uma vez;

Ag2 – algodão com sabão em pó, lavado duas vezes;

LE3 – lavagem ecológica com sabão em pó e alvejante em pó, lavado apenas uma vez;

LE4 – lavagem ecológica com sabão em pó e alvejante em pó, lavado duas vezes;
 LD3 – lavagem diária com sabão em pó e alvejante em pó, lavado apenas uma vez;
 LD4 – lavagem diária com sabão em pó e alvejante em pó, lavado duas vezes;
 Ag3 – algodão com sabão em pó e alvejante em pó, lavado apenas uma vez;
 Ag4 – algodão com sabão em pó e alvejante em pó, lavado duas vezes;
 Ct – grupo controle.

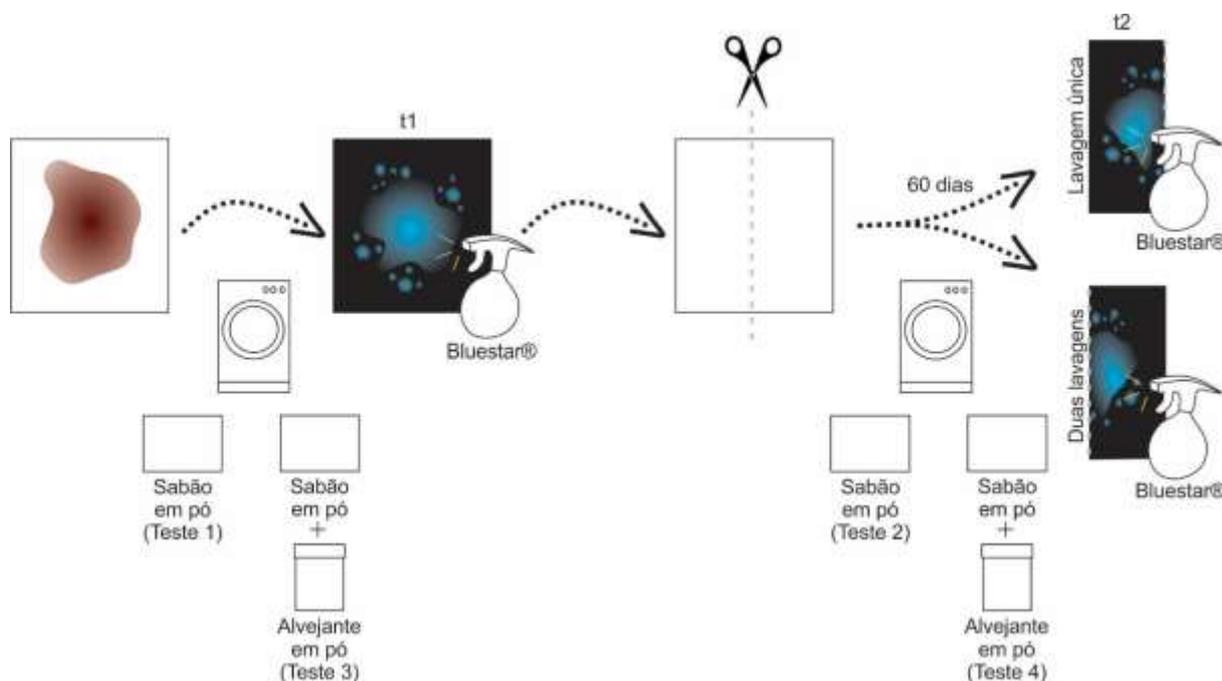


Figura 3. Esquema da metodologia para corpos de prova em que foi utilizado sabão em pó e alvejante em pó.

Os corpos de prova foram mantidos em ambiente aberto, com ventilação e iluminação após as lavagens. O reagente químico Bluestar® foi utilizado sobre os corpos para posterior visualização em ambiente escuro.

2.2. Coleta de Dados

O período de tempo avaliado consistia em intervalos de 1 dia (t1) e 60 dias (t2). Assim, decorrido o tempo necessário para o primeiro teste (t1), o reagente químico Bluestar® (Roc Import Group, Monaco) foi aplicado sobre os sete corpos de prova conforme orientação do fabricante, em ambiente parcialmente escuro. As instruções do manual do produto mencionado consistem em adicionar um par de tabletes de Bluestar® em um borrifador com 125ml de água destilada; é necessário fazer movimentos circulares para que haja a dissolução e, assim, realizar a aplicação da solução. Em t2, sob as

mesmas orientações e ambiente, também procedeu-se a aplicação do Bluestar® em todos os corpos de prova.

Sobre cada corpo de prova, foi borrifado o reagente Bluestar®. As fotografias foram realizadas com câmera de celular Iphone 8 (Apple, Cupertino) em ambiente com pouca iluminação.

Nesse estudo, a análise perceptiva visual foi a forma de avaliação escolhida para identificação da reação quimiluminescente do reagente Bluestar®.

A pesquisa foi submetida à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa e aprovada pelo protocolo de número 83724818.1.0000.5220.

3. Resultados

Após aplicação do reagente Bluestar® nos grupos da primeira lavagem e grupo controle, a quimiluminescência em t1 foi evidente em todos os corpos de prova. Após a segunda lavagem, em t2, os grupos LD2, Ag2, LE4, LD4 e Ag4 não evidenciaram nenhum sinal de quimiluminescência (Tabela 1). O grupo controle manteve sua quimiluminescência tanto em t1 quanto em t2.

Tabela 1. Indicação da presença ou ausência de quimiluminescência.

Grupos	Primeira fase – t1 Houve quimiluminescência?	Segunda fase – t2 Houve quimiluminescência?
LE1	Sim	Sim
Ag1		Sim, mas pouco pronunciada
LD1		Sim, mas pouco pronunciada
LE2		Sim, mas pouco pronunciada
LD2		Não
Ag2		Não
LE3	Sim	Sim, mas pouco pronunciada
LD3		Sim, mas pouco pronunciada
Ag3		Sim, mas pouco pronunciada
LE4		Não
LD4		Não
Ag4		Não
Ct	Sim	Sim

As Figuras 4 e 5 mostram a diferença da quimiluminescência gerada pelo Bluestar® entre as lavagens do ciclo algodão com sabão em pó (Ag1, Ag2) e lavagens

do ciclo lavagem ecológica com sabão em pó (LE1, LE2), respectivamente. Esses foram os corpos de prova que apresentaram maior diferença de quimiluminescência entre as duas fases dos testes.

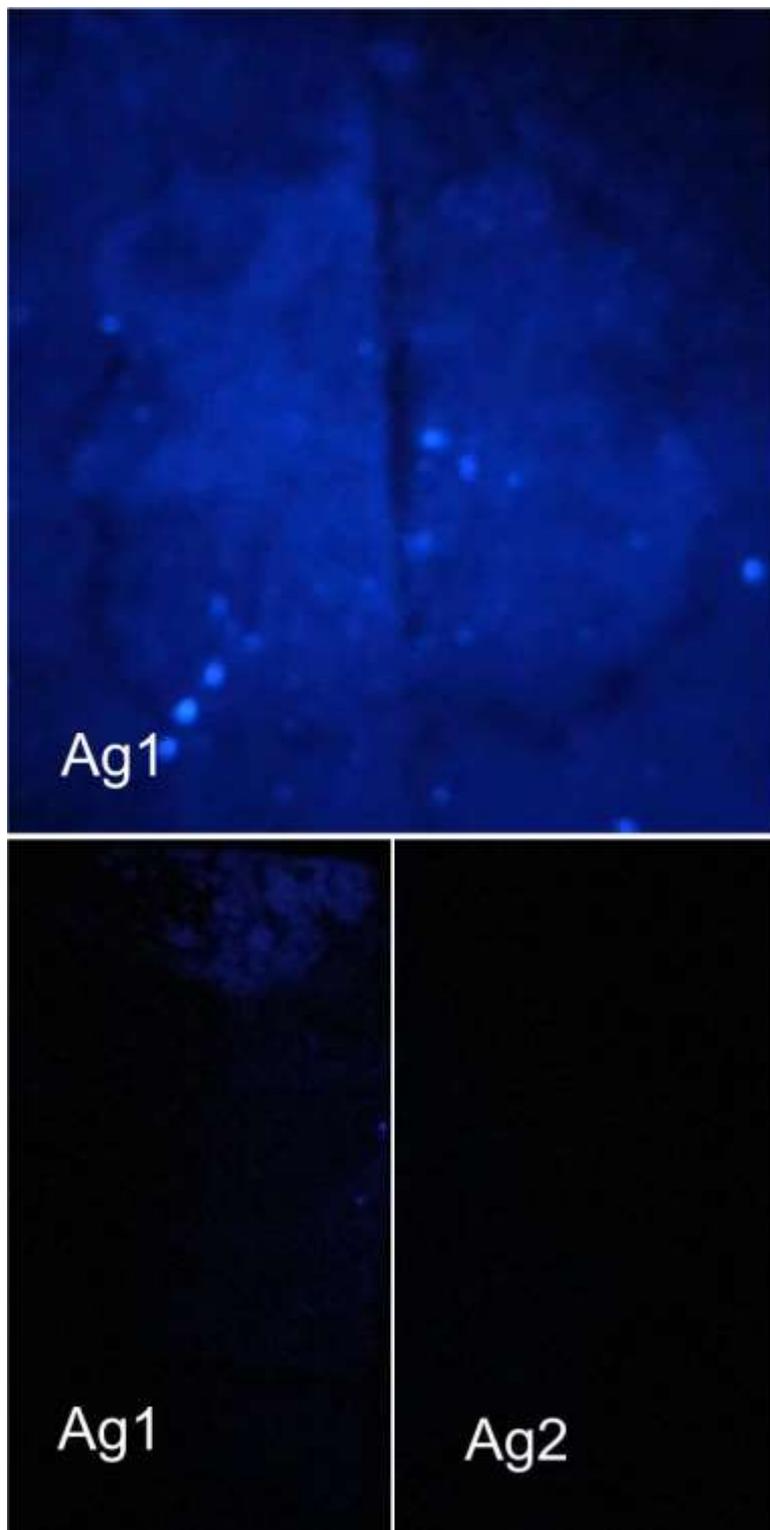


Figura 4. Corpos de prova Ag1 em t1 na parte superior; corpos de prova Ag1 e Ag2 na parte inferior em t2.

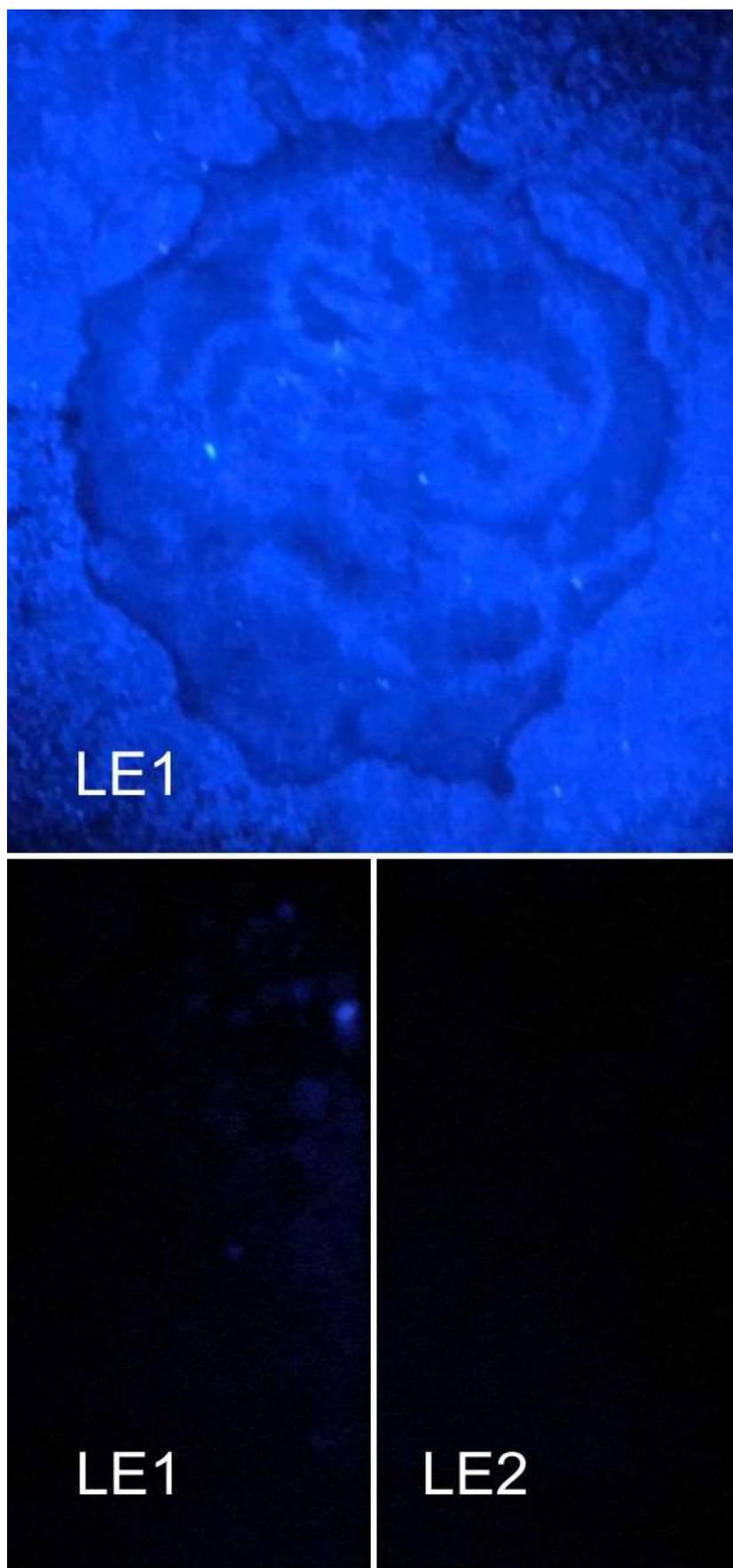


Figura 5. Corpos de prova LE1 em t1 na parte superior; corpos de prova LE1 e LE2 na parte inferior em t2.

4. Discussão

Conforme observação dos corpos de prova nos momentos de aplicação do reagente Bluestar®, foi possível verificar que em t1 todos os corpos de prova apresentaram quimiluminescência indo ao encontro do estudo que lavou com água e sabão em pó manchas experimentais de sangue em diferentes superfícies por uma vez, sendo usado o mesmo reagente¹¹. Já em t2, apenas dois corpos de prova – LE1 e Ag1, ambos lavados apenas com sabão em pó – apresentaram quimiluminescência enquanto que cinco corpos de prova (LE2, LD1, LE3, Ag3) foram pouco evidenciados e o restante (LD2, Ag2, LE4, LD4, Ag4) não apresentou nenhum sinal. Esse achado vai de encontro aos achados de Ponce *et al.* (2002)¹², no qual os resultados mostraram que é possível detectar manchas de sangue com luminol que foram lavadas até 10 vezes.

Nesse estudo, observou-se que todos os grupos lavados duas vezes com sabão em pó e alvejante em pó não produziram reação quando o reagente Bluestar® foi aplicado. Também salienta-se que após 60 dias, mesmo sem uma segunda lavagem, a intensidade da quimiluminescência reduziu consideravelmente, como nos casos dos grupos LE1, LE3, LD3, Ag3. Diferentes resultados foram encontrados por Vieira *et al.* (2016)¹¹, que demonstraram que o reagente Bluestar® foi eficaz na detecção de manchas de sangue em tecido de algodão após a lavagem dos substratos com água e sabão em pó, passados 30 dias da aplicação.

A reação quimiluminescente foi suficientemente evidenciada em t2 apenas em dois grupos (Ag1 e LE1) que sofreram lavagem. O caso relatado por Miranda *et al.* (2016)³ registra uma intensa reação do luminol em uma parede, mesmo tendo sido pintada e retirada a camada de tinta. Reações pouco evidentes podem ser interpretadas como falso positivo, por isso é imprescindível que parâmetros como intensidade, cor, duração e distribuição espacial sejam analisadas³. Rápido aparecimento, brilho e duração breve caracterizam um falso positivo, que pode ser observado em testes com substâncias como cobre, lustra-móveis, nabo e tintas esmaltadas¹³.

Existem estudos que relatam o efeito de produtos de limpeza nos procedimentos de busca e confirmação da presença de sangue. Castelló *et al.* (2009a)¹⁴ afirmam que os novos detergentes apresentam efeito deletério. Castelló *et al.* (2009b)¹⁵ mostram que os resultados de seus estudos comprovam que produtos contendo oxigênio ativo (ou percarbonato de sódio), como o caso do alvejante em pó

usado na presente pesquisa, impedem resultados positivos usando testes presuntivos. Em estudo posterior¹⁶, estes mesmos autores comprovaram que o percarbonato de sódio causa danos às manchas de sangue. A eficácia dessa substância foi corroborada por Oldfield *et al.* (2017)¹⁷, os quais afirmam que condições como temperatura de lavagem, tempo de secagem, elementos ambientais, entre outros, podem melhorar essa propriedade do reagente.

5. Conclusão

Com este estudo preliminar, conclui-se que o reagente Bluestar® apresentou quimiluminescência em tecidos de algodão manchados de sangue após 1 dia de lavagem, tanto na lavagem com água e sabão em pó quanto na lavagem com água, sabão em pó e alvejante em pó. Entretanto, após 60 dias, em grupos que tiveram e os que não tiveram uma segunda lavagem, Bluestar® apresentou pouca quimiluminescência, podendo ser confundido com falso positivo, ou não apresentou reação quimiluminescente, como foi o caso dos grupos onde foi usado o alvejante em pó sem cloro.

Nesta pesquisa, o oxigênio ativo do alvejante em pó sem cloro teve influência negativa em testes presuntivos com Bluestar. Essa substância manteve sua eficácia independentemente do tipo de lavagem utilizada.

É necessário que sejam feitos mais estudos em relação a aplicação do Bluestar® em tecidos lavados. Também é aconselhável uma investigação mais aguçada sobre o percarbonato de sódio e sua interferência em manchas de sangue para maior elucidação e consequente resolução da questão.

Referências

1. Brasil. Decreto-Lei nº. 3.689, de 03 de outubro de 1941. Diário Oficial da União 13 out 1941.
2. Almeida, Juliana Piva de. Influência dos testes de triagem para detecção de sangue nos exames imunológicos e de genética forense [Dissertação de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular]. Porto Alegre: Faculdade de Biociências, PUC-RS; 2009.
3. Tobe SS, Watson N, Daeid NN. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. *J Forensi Sci.* 2007; 52(1):102-9. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00324.x>

4. Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta* 2007; 72: 896–913. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.12.045>
5. Seashols SJ, Cross HD, Shrader DL, Rief A. A Comparison of Chemical Enhancements for the Detection of Latent Blood. *J Forensic Sci*, 2013; 58(1): 130-3. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2012.02259.x>
6. Ferreira EC, Rossi AV. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. *Quím Nova*. 2002; 25(6): 1003-1011. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000600018>
7. Sawaya MCT, Rolim MRS. *Manual Prático de Medicina Legal no Laboratório*. 1 ed. Curitiba: Juruá; 2004. 150 p.
8. Pitarch PG, Pascual FV, Ponce AC, Muñoz MCN. Técnica de criminalística en manchas de sangre: factor ambiental en las pruebas de orientación. *Revista de la Escuela de Medicina Legal*. 2010; 14.
9. Miranda GE, Paula WX, Romano A, Santos VRDE, Melani RFH. Detecção de manchas de sangue pelo luminol onde houve entintamento das paredes – estudo de caso. *Rev Bras Crimin*. 2016; 5(1): 14-17. <https://doi.org/10.15260/rbc.v5i1.119>
10. James SH, Kish EP, Sutton TP. *Principles of Bloodstain Pattern Analysis – Theory and Practice*. 1. ed. Florida: Boca Raton; 2005. 576 p.
11. Vieira CSM, Angheben CZ, Delwing F, Fernandes MM, Tinoco RR, Baldasso RP. Comportamento do Reagente Bluestar® em Manchas de Sangue Frente a Diferentes Tempos, Superfícies e Lavagem. *Brazilian Journal of Forensic Sciences*, 2016; 5(4): 402-409.
12. Ponce AC, Seguí MA, Feucht MM, Pascual FAV. Revelado de manchas latentes: efectividad del luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio del DNA. *Cuadernos de Medicina Forense*, 2002; 28: 33-36.
13. Creamer JI, Quickenden TI, Apanah MV, Kerr KA, Robertson P. A comprehensive experimental study of industrial, domestic and environmental interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence*. 2003; 18: 193-198. <https://doi.org/10.1002/bio.723>
14. Castelló A, Frances F, Verdu F. Bleach interference in forensic luminol tests on porous surfaces: more about the drying time. *Talanta*. 2009a; 77: 1555–1557. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.008>
15. Castelló A, Francès F, Corella D, Verdú F. Active oxygen destroys the evidence. *Naturwissenschaften*, 2009b; 96: 303-307. <https://doi.org/10.1007/s00114-008-0466-9>

16. Castelló A, Francès F, Corella D, Verdú F. Chemistry in Crime Investigation: Sodium Percarbonate Effects on Bloodstains Detection. *J Forensic Sci*, 2012; 57(2): 500-2. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01999.x>
17. Oldfield C, Morgan RM, Miles HF, French JC. The efficacy of luminol in detecting bloodstains that have been washed with sodium percarbonate and exposed to environmental conditions, *Australian Journal of Forensic Sciences*, 2017; 50(4): 345-354. <https://doi.org/10.1080/00450618.2016.1264478>